UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 — N° 236

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE SÉROLOGIQUE DU PALUDISME

## RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE RAT PARASITÉ PAR « PLASMODIUM BERGHEI »

Travail effectué au Laboratoire de Sérologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*présentée et soutenue publiquement le Mardi 11 Décembre 1956*

PAR

**DUONG HÔNG MÔ**

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE TROPICALE
MONITEUR AU LABORATOIRE DE SÉROLOGIE

Né à Ninh-Giang (Viet-Nam), le 23 Décembre 1930

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
TAYEAU, professeur.....
MAYER, professeur..... *Juges*
PAUTRIZEL, professeur .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1956

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0018

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 — N° 236

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE SÉROLOGIQUE DU PALUDISME

## RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE RAT PARASITÉ PAR « PLASMODIUM BERGHEI »

Travail effectué au Laboratoire de Sérologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*présentée et soutenue publiquement le Mardi 11 Décembre 1956*

PAR

**DUONG HÔNG MÔ**

ÉLÈVE DE L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE TROPICALE
MONITEUR AU LABORATOIRE DE SÉROLOGIE

Né à Ninh-Giang (Viet-Nam), le 23 Décembre 1930.

Examinateurs de la Thèse

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
TAYEAU, professeur.....
MAYER, professeur..... *Juges*
PAUTRIZEL, professeur .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1956

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

# FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

**DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.**

**DOYEN : M. SIGALAS. — ASSESSEUR : M TAYEAU.**

## PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE. DUVERGEY, CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, BEAUVIEUX, CREYX, MAURIAC

## PROFESSEURS :

| | MM. |
|---|---|
| Clinique médicale | DE GRAILLY<br>BROUSTET |
| Clinique chirurgicale | PAPIN<br>MASSE |
| Clinique d'accouchements | M. RIVIERE |
| Clinique gynécologique | MAGENDIE |
| Anatomie pathologique et microscopie clinique | LEGER |
| Anatomie | DUFOUR |
| Anatomie générale et histologie | MAYER |
| Hygiène et Clinique de la tuberculose | PIECHAUD |
| Médecine légale et médecine du travail | DERVILLEE |
| Electroradiologie et clinique d'électricité médicale | REBOUL |
| Chimie | MESNARD |
| Matière médicale | MASQUELIER |
| Pharmacie | VITTE |
| Physiologie | FABRE |
| Clinique médicale des maladies des enfants | FONTAN |
| Zoologie et parasitologie | SIGALAS |

| | MM. |
|---|---|
| Pathologie générale et expérimentale | SARIC |
| Clinique ophtalmologique | BESSIERE |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie | POUYANNE |
| Clinique médicale et des maladies infectieuses | AUBERTIN |
| Chimie biologique et médicale | TAYEAU |
| Physique médicale et pharmaceutique | PIFFAULT |
| Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques | MORETTI |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques | JOULIA |
| Clinique des maladies des voies urinaires | DARGET |
| Clinique des maladies nerveuses et mentales | DELMAS-MARSALET |
| Clinique d'oto-rhino-laryngologie | G. PORTMANN |
| Toxicologie et hygiène appliquée | CASTAGNOU |
| Clinique odonto-stomatologique | DUBECQ |
| Botanique et cryptogamie | GIRARD |
| Thérapeutique | F.-J. TRAISSAC |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie | DUBARRY |
| Carcinologie | LACHAPELE |

## PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

## PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie), Mlle ROUGIER (Physiologie), M. MOUSTARDIER (Bactériologie)
M. CAZAUX (Pharmacie 3e Section)

## MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

| | MM. |
|---|---|
| Anatomie | RIGAUD<br>CABANIE |
| Biochimie médicale | NEUZIL |
| Pathologie expérimentale | FAURE |

| | MM. |
|---|---|
| Physique médicale | DUHAMEL |
| Pharmacie (1re Section) | R. GOLSE<br>ROMAIN |
| Pharmacie (2e Section) | QUILICHINI |

## CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

MM. STOLL (Histologie), MARQUEVIELLE (Biochimie médicale)

## AGRÉGÉS EN EXERCICE :

| | MM. |
|---|---|
| Médecine générale | BERGOUIGNAN<br>LENG-LEVY<br>LAVIGNOLLE<br>MARTIN-DUPONT<br>DAVID-CHAUSSE<br>J. RIVIERE |
| Chirurgie générale | LAUMONIER<br>CHAVANNAZ<br>VILLAR<br>TINGAUD<br>DEPAULIS<br>DARMAILLACQ |

| | MM. |
|---|---|
| Obstétrique | CHASTRUSSE<br>FAUGERE |
| Ophtalmologie | CORCELLE |
| Oto-rhino-laryngologie | DESPONS<br>M. PORTMANN |
| Dermatologie et syphiligraphie | LE COULANT |
| Pédiatrie et puériculture | VERGER |
| Médecine légale et médecine du travail | L'EPEE |
| Odonto-stomatologie | BENOIT |
| Urologi | LANGE |
| Neurologie et psychiatrie | BLANC |
| Pneumo-phtisiologie | FREOUR |

## COURS COMPLÉMENTAIRES :

| | MM. |
|---|---|
| Médecine opératoire | LAUMONIER |
| Accouchements | CHASTRUSSE<br>FAUGERE |
| Puériculture | VERGER<br>PERY |
| Législation pharmaceutique | COUSTOU |
| Cryptogamie | LAUBIE |
| Obstétricie sociale | MAHON |
| Organographie et physiologie végétale | TEMPERE |
| Chimie biologique analytique | NIVET |
| Chimie analytique | BABIN |
| Pathologie chirurgicale | VILLAR<br>CHAVANNAZ<br>TINGAUD<br>DARMAILLACQ<br>LAPORTE |

| | MM. |
|---|---|
| Zoologie pharmaceutique | BAILENGER |
| Physiologie | Mme LINQUETTE |
| Toxicologie et Hygiène | Mlle LARCEBAU |
| Phytopharmacie | CORTESI |
| Droit médical international | AUBY |
| Médecine légale | L'EPEE |
| Séméiologie médicale | J. RIVIÈRE |
| Séméiologie chirurgicale | DEPAULIS |
| Embryologie | STOLL |
| Pathologie médicale | BERGOUIGNAN<br>LEVY<br>LAVIGNOLLE<br>DAVID-CHAUSSE<br>RIVIERE<br>MARTIN-DUPONT |

*Le Secrétaire principal de la Faculté :* André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

---

A MON FRÈRE AINÉ

---

A MES FRÈRES ET SŒURS

---

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

---

**A MES AMIS**

AUX PERSONNELS

DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

A L'HOPITAL SAINT-ANDRÉ

ET DU LABORATOIRE DE SÉROLOGIE

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE BORDEAUX

Qui nous ont constamment aidé et manifesté toute leur sympathie à notre égard.
Qu'il reçoivent nos vifs remerciements.

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL DE 1re CLASSE TABET

COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DU MÉRITE MARITIME

MÉDAILLE DES ÉPIDÉMIES

SPÉCIALISTE DES HÔPITAUX MARITIMES

COMMANDEUR DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

---

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL DE 1re CLASSE GALIACY

INSPECTEUR TECHNIQUE DU SERVICE DE SANTÉ

GRAND OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

MÉDAILLE DE LA RÉSISTANCE

OFFICIER D'ACADÉMIE

SPÉCIALISTE DU HÔPITAUX MARITIME

OFFICIER DU MÉRITE MARITIME

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL DE 2e CLASSE LAHILLONNE

DIRECTEUR DE L'ÉCOLE PRINCIPALE
DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES
MÉDECIN DES HÔPITAUX DE LA MARINE
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE 1939-1945
OFFICIER DU MÉRITE MARITIME

---

A MONSIEUR LE MÉDECIN EN CHEF DE 1re CLASSE CONSTANS

SOUS-DIRECTEUR DE L'ÉCOLE PRINCIPALE
DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES
SPÉCIALISTE DES HÔPITAUX MARITIMES
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE 1939-1945

---

A NOS MAITRES
DE L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES

---

A L'ÉCOLE PRINCIPALE
DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE
ET DES TROUPES COLONIALES

Qui a été notre foyer pendant six ans. Qui nous a formé aux points de vue moral et professionnel.

## A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

---

## A NOS JUGES

### MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

DOCTEUR ÈS SCIENCES
DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE
EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
CROIX DE GUERRE 1939-1945
CHEVALIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Mon cher Maître,

Vous nous avez guidé pas à pas depuis trois ans. Nous vous devons notre formation biologique et cette thèse dont vous avez été l'inspirateur; vous avez surveillé ces recherches tous les jours. Nous n'oublierons jamais votre bonté et votre bienveillance.

Puisse ce modeste travail ne pas decevoir la confiance dont vous nous avez fait preuve.

Veuillez trouver ici l'expression de notre grande admiration et notre vive reconnaissance.

### MONSIEUR LE PROFESSEUR G. MAYER

PROFESSEUR D'ANATOMIE GÉNÉRALE ET HISTOLOGIE
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Nous sommes heureux d'avoir pu bénéficier de son enseignement magistral qui nous a laissé la plus profonde impression.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

### MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
ASSESSEUR DU DOYEN
DOCTEUR ÈS SCIENCES
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES
MÉDAILLE D'HONNEUR DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Nous ressentons très vivement l'honneur qu'il nous fait de siéger aujourd'hui parmi nos juges.

Nous lui sommes reconnaissant de l'enseignement clair et attrayant qu'il nous a donné au cours de nos études médicales. L'accueil le plus aimable nous a toujours été réservé dans son service.

Qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre respect.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

## MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

CHEVALIER DU MÉRITE MARITIME

COMMANDEUR DANS L'ORDRE DE L'ÉTOILE NOIRE

Mon cher Maître,

Votre enseignement si clair et si précis a jeté les bases de nos connaissances en parasitologie. Par la suite, vous vous êtes toujours intéressé avec une paternelle bienveillance aux progrès de nos recherches.

Nous sommes heureux de pouvoir vous exprimer, en tant que Président de thèse, notre très profonde gratitude et toute notre reconnaissance.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE SÉROLOGIQUE DU PALUDISME

## RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE RAT PARASITÉ PAR «PLASMODIUM BERGHEI»

---

## INTRODUCTION

Depuis longtemps, des recherches ont été faites pour améliorer le diagnostic du paludisme. La recherche directe au microscope du plasmodium constitue toujours le critère de choix, pratiquement le seul jusqu'à nos jours qui impose le diagnostic.

Cependant, dans beaucoup de cas, les parasites n'apparaissent pas dans le sang circulant. Dans le paludisme viscéral, dans le paludisme latent, dans le paludisme de première invasion à *Plasmodium falciparum*, on décèle peu ou pas de parasites. En outre, n'importe quelle infection peut réactiver un paludisme latent, faisant apparaître quelques parasites dans le sang circulant.

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés à la sérologie du paludisme. Nous envisageons dans le premier chapitre de ce travail les différents tests sérologiques essayés successivement. Puis peu à peu les auteurs ont adopté la méthode de déviation du complément, méthode qui a fait ses preuves de sensibilité et de spécificité dans de nombreuses parasitoses, en particulier dans le diagnostic de la syphilis.

La réaction de fixation du complément demande un antigène aussi spécifique et aussi pur que possible. Peu à peu les recherches progressent dans cette voie vers une amélioration de plus en plus poussée du matériel antigénique. La préparation de l'antigène et des immun-

sérums fera l'objet de nos deuxième et troisième chapitres.

Mais d'autres difficultés subsistent. Le peu de richesse en anticorps demande une activation de la réaction antigène-anticorps paludéen. Notre expérimentation fait intervenir des procédés physiques et chimiques dans ce but et ceci sera étudié dans le quatrième chapitre.

Enfin le cinquième chapitre est réservé à une application de ces différents procédés dans le cas du couple antigène-anticorps syphilitique.

La mise au point d'une réaction sérologique permettant de détecter des anticorps chez le Rat serait d'une grande utilité pour les recherches sur les mécanismes de défense de cet animal vis-à-vis de l'infection palustre.

Grâce à la souche de *Plasmodium Berghei* qui se développe facilement chez le Rat et la Souris, on peut envisager bon nombre de recherches qui étaient difficilement réalisables autrefois. En effet, il existe peu d'espèces de mammifères chez lesquelles les plasmodiums peuvent évoluer.

# CHAPITRE PREMIER

## TESTS SÉROLOGIQUES DES MALADIES A PLASMODIUMS

Les premiers, Lo Monicho et Panichi [21], en 1901, signalèrent que le sérum paludéen dilué agglutine les hématies des paludéens. La propriété précipitante du sérum paludéen était étudiée ensuite par Pewny [30] en 1918, Zieman [36] en 1924, puis Taliaferro [33] en 1927 avec des résultats douteux. Eaton, Single, Mulligan [14] s'intéressèrent à la propriété agglutinante du sérum paludéen qui agglutine les parasites *in vitro*. Chez le singe infecté par le *Plasmodium Knowlesi*, le taux d'agglutinine est très faible au début, puis s'élève progressivement; on a vu des sérums qui agglutinent les parasites jusqu'à la dilution de 1 p. 1000. Il semble que l'agglutinine est spécifique, il n'y a pas de réaction de groupe. Malamos [23] a étudié l'agglutination des parasites *in vivo*, dans l'organisme du singe infecté par le *Pl. Knowlesi* et dans celui du poulet infecté par le *Pl. gallinaceum*.

Puis ce fut la réaction de Henry. Elle consiste en une floculation du sérum mis en présence de mélanine ou d'un sel de fer. Mais des études ultérieures montrèrent le caractère aspécifique de cette réaction. Chorine [4] provoqua la même floculation par adjonction au sérum de l'eau

distillée. Il montra que tous les sérums humains et animaux floculent en présence de mélanine [5], que la réaction de Henry varie d'un jour à un autre pour un même sérum [3]. Puis d'autres auteurs provoquèrent la même floculation avec l'adjonction d'un colorant colloïdal et surtout du rouge congo (Carlson [2]). La réaction de Henry n'est donc qu'un phénomène de déséquilibre plasmatique sans aucune valeur immunologique.

Dès 1907, avec de Blasi [10], on a commencé à voir la possibilité de la réaction de fixation du complément dans le paludisme. De Blasi, Massa [25], Gasparini [15], Thomson [34], Horrowitz Wlassowa [18] employaient des organes ou du sang humain parasités comme matériel antigénique et les résultats furent contradictoires. Lowel [22] utilisa comme antigène l'extrait de rate de singe infecté, et Massa [25] le placenta de la femme paludéenne. Vargues [35] lui aussi chercha dans la même voie et obtint des succès. Son antigène est un extrait de rate et de foie de rat impaludé. Ces organes sont prélevés chez l'animal agonisant, soumis ensuite à un début d'autolyse par séjour à la glacière pendant quatre ou cinq jours. Puis ils sont broyés en présence de 0,9 g de chlorure de sodium, l'hypertonie libérant les liquides cellulaires. On ramène le tout à l'isotonie par addition d'eau distillée, par centrifugation on recueille le liquide surnageant qui est l'antigène.

Les extraits d'organes ont cependant un grave défaut. Les broyats de tissus mélangés avec l'antigène sont autant de facteurs susceptibles soit d'inhiber la réaction spécifique, soit de provoquer des fausses réactions positives. Peu à peu les auteurs s'attachent à utiliser comme matériel antigénique du sang parasité, ou mieux encore, seulement des hématies parasitées.

Christophers et Fulton [6] recueillirent les plasmodiums en soumettant les hématies parasitées à la saponine qui lyse les hématies. Puis Coggeshall [7] prépara le

premier antigène de ce type, à partir d'hématies parasitées par le *Plasmodium Knowlesi*. Après congélation et déshydratation, les hématies parasitées sont réhydratées et diluées dans une solution de chlorure de sodium à 1 p. 100.

Dulaney et Stratman-Thomas [13] travaillèrent sur à peu près le même antigène et les résultats tirés des expériences multiples sur les sérums de paludéens furent encourageants. Cet antigène à *Plasmodium Knowlesi* réagit avec les sérums de malades infectés par *Pl. vivax*, *malariæ* et *falciparum* : la réaction de groupe existe, le diagnostic sérologique est possible.

Dulaney et Morrison [11] perfectionnèrent la technique : ils multiplièrent les congélations, décongélations et broyages. L'antigène est un extrait salé de plasmodiums mais ces auteurs constatèrent que leur antigène devient six à huit fois plus puissant sous l'influence d'un tampon au phosphate ou d'un tampon au véronal. Ils attribuèrent ce succès à l'alcalinité, mais un essai avec de la soude les conduisit à un échec. Ce n'est pas l'alcalinité mais le pouvoir tampon qui améliore l'antigène.

Lippincott et Gordon [20] se sont intéressés au *Plasmodium gallinaceum*, parasite du poulet. L'antigène est simplement du sang parasité lyophylisé et, essayé sur des sérums humains paludéens, il donne des résultats satisfaisants.

Davis-Bernard [9] essaya l'antigène au *Pl. lophurae* préparé par congélations et décongélations par triturations du sang de canard parasité par ce plasmodium. Cet antigène réagit avec le sérum du singe infecté par le *Pl. Knowlesi*.

Pautrizel et Nguyên Vinh Niên [27, 28] ont préparé l'antigène à *Pl. Berghei*, parasite du rat blanc. Les hématies parasitées sont recueillies par centrifugation différentielle puis congelées et broyées.

Ces différents antigènes ont été éprouvés sur des sérums humains. L'antigène de Dulaney, essayé avec de nom-

breux sérums paludéens, donne une sérologie qui est en accord dans 81 % des cas avec le résultat des frottis [12]. La réaction reste positive deux mois ou plus après la disparition du parasite dans le sang circulant.

Coggeshall [7] essaya son antigène sur des malades soumis à la malariathérapie. Les réactions sont positives peu avant l'acmé de l'infection et restent positives environ cinq mois après la disparition du parasite du sang.

Kliger et Yoeli [19] expérimentèrent avec le même antigène sur des sérums des habitants des régions endémiques. 98 % des enfants de ces régions présentent une sérologie positive, de même les adultes. Ces auteurs ont en outre vérifié les réactions croisées entre antigènes à base de *Pl. Knowlesi* et *Pl. gallinaceum* et sérums humains paludéens.

L'antigène au *Pl. gallinaceum* de Lippincott [20] ne donne que 1 % de fausses réactions positives chez les sujets bien portants, mais ce pourcentage augmente jusqu'à 5 % chez les malades syphilitiques. 58 % des réactions sont positives pendant la période des attaques, et la positivité persiste jusqu'à six mois après.

Sutliff et Dulaney [32] trouvent que l'accord entre la recherche des parasites dans le sang et la sérologie est réalisé dans 89 % des cas. La réaction peut être positive alors que les frottis minces ne montrent pas de parasites, dans le cas où les antécédents de paludisme existent depuis moins d'un an. Les sérums de sujets bien portants ou ayant des antécédents de paludisme datant de plus d'un an montrent tous une sérologie négative à part quelques réactions douteuses.

Harris et Reidel [17] essayèrent systématiquement à la fois l'antigène à *gallinaceum* et l'antigène à *Knowlesi*. Ils disposèrent de 629 sérums de volontaires infectés de sporozoïtes de plasmodiums. En général les réactions sont fortement positives dans le cas où le parasite est visible sur frottis mince. L'antigène à *Knowlesi* et l'antigène à

*gallinaceum* sont tous deux efficaces, avec cependant une activité plus grande de l'antigène à base de *Pl. gallinaceum*.

A titre de témoin, ces auteurs expérimentèrent sur 961 sérums normaux. La proportion de fausses réactions positives s'élève à 1 % environ pour chacun des deux antigènes. Les sérums des tuberculeux ne donnent pas de fausses réactions positives. Celles-ci existent dans environ 4 % des cas chez les sérums des syphilitiques.

# CHAPITRE II

## PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE

Nous employons du sang de Rat blanc infecté par le *Plasmodium Berghei*. Le sang est prélevé chez l'animal au moment où les parasites sont les plus volumineux et les plus nombreux, environ au 7e jour après l'inoculation. Le prélèvement se fait soit par la voie oculaire décrite par Halpern et Pacaud [16], soit par ponction cardiaque (Nguyên Vinh Niên [27, 28]). L'anticoagulant employé est l'héparine à dose très faible (0,15 mg par $cm^3$ de sang) de façon à éviter son activité anticomplémentaire.

### I. — ÉLIMINATION DU PLASMA ET DES GLOBULES BLANCS. SÉPARATION DES HÉMATIES PARASITÉES

La technique a été mise au point par Pautrizel et Nguyên Vinh Niên [27, 28].

« Dès son prélèvement, le sang est centrifugé à 2.000 tours/minute pendant vingt minutes en présence d'un demi-volume de Subtosan dilué à la densité voulue.

« On obtient plusieurs couches :

« 1° Une couche inférieure rouge, constituée par les hématies normales.

« 2° Une couche moyenne, légèrement rouge-brunâtre représentant les hématies parasitées en suspension dans le Subtosan.

« 3° Une couche blanchâtre, correspondant aux globules blancs.

« 4° Une couche supérieure liquide qui est le plasma.

« A l'aide d'une pipette stérile, on aspire le plasma et les globules blancs qu'on rejette.

« On recueille ensuite la portion contenant les hématies parasitées. Comme la séparation entre les deux couches d'hématies normales et d'hématies parasitées n'est pas bien nette, il convient, par mesure de précaution, de prélever jusqu'à un niveau légèrement supérieur à la limite présumée.

« On lave cette portion plusieurs fois avec l'eau physiologique contenant 100 mg p. 100 de glucose et tamponnée à *p*H 7. Il convient en effet, pour éviter l'altération des parasites, de leur fournir certains facteurs pendant toute la durée de la préparation. »

## II. — ÉLIMINATION DE L'HÉMOGLOBINE

Les globules parasités lavés sont lysés à l'eau distillée froide glucosée et tamponnée à *p*H 7. La lyse se fait pendant une heure à la glacière avec de fréquentes agitations. Puis par centrifugation on élimine l'hémoglobine et le culot est lavé plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surnageant soit complètement clair.

## III. — FRACTIONNEMENT DE L'ANTIGÈNE

Nous avons d'abord essayé les congélations et décongélations avec broyage au mortier entre chaque opération. Ces opérations sont faites au moins dix fois pour améliorer l'antigène autant que possible (Dulaney et Morrison [11]).

Nous avons pensé utiliser les ultrasons pour le fractionnement de l'antigène. Ceux-ci ont un pouvoir pulvérisant incomparablement supérieur aux broyages et d'autre part ont l'avantage de ne pas exiger des congélations et décongélations, opérations qui risquent de diminuer l'activité antigénique.

Les hématies parasitées lysées et débarrassées d'hémoglobine sont mises en suspension dans l'eau distillée puis soumises aux ultrasons pendant quarante minutes sous atmosphère d'azote [1].

Puis la suspension obtenue est ramenée à l'isotonie et diluée dans l'eau physiologique phéniquée, de telle façon que l'acide phénique y soit dans la concentration de 0,3 p. 100. Ceci représente notre solution-mère d'antigène. Elle est conservée à la glacière à + 4° et nous effectuons un titrage de l'antigène pour chaque lot d'antigène que nous préparons afin de déterminer la dilution optimum d'antigène à employer. En général, l'antigène dilué au 1/10 ou au 1/15 donne les meilleurs résultats.

Il est à remarquer que notre antigène contient, à part l'extrait plasmodial, les produits en provenance du stroma et ceux-ci constituent autant de substances étrangères nuisibles à la réaction antigène-anticorps paludéen. Nous évitons leur action de la façon suivante : dans toutes nos réactions, le sérum avant d'être mis en présence de l'antigène est décomplémenté puis mis en présence d'une suspension contenant du stroma d'hématie normale pendant trente minutes, à 37°. Puis le sérum est centrifugé et peut servir pour la réaction proprement dite.

---

(1) Caractéristiques : quartz de sept minutes; voltage : 2.500 volts; l'opération est interrompue toutes les dix minutes pour éviter toute élévation de température.

Cette technique a été réalisée grâce à l'obligeance et au concours de M. le Professeur Blanquet et de M. Mounier, du Laboratoire de Physique médicale, et nous sommes heureux de les remercier ici.

# CHAPITRE III

## PRÉPARATION DES IMMUN-SÉRUMS

### I. — PRÉPARATION DES IMMUN-SÉRUMS PAR INOCULATION DE *PLASMODIUMS BERGHEI* VIVANTS

De gros rats de 200 g et plus sont inoculés par voie intrapéritonéale avec des doses d'environ 500.000 parasites. Ces animaux font une infection au *Plasmodium Berghei* puis guérissent. On recommence l'inoculation, ainsi de suite, trois ou quatre fois. Une semaine après la dernière injection on recueille le sérum de chaque animal.

### II. — PRÉPARATION DES IMMUN-SÉRUMS PAR INOCULATION DE PARASITES TUÉS

Le sang de Rat parasité est soumis à la congélation de — 25° puis à la décongélation. On inocule ce sang à des rats normaux, par voie intrapéritonéale et intramusculaire, d'après le protocole suivant :

Inoculation : 1er, 4e, 12e, 17e jours ; repos cinquante-quatre jours.

Inoculation : 55e, 56e, 60e, 63e, 68e jours ; prélèvement de sang le 78e jour.

## III. — PRÉPARATION DES IMMUN-SÉRUMS PAR INOCULATION DE L'ANTIGÈNE ULTRASONNÉ DE *PL. BERGHEI*

Dose : 1 cm³ de solution-mère d'antigène + 0,20 cm³ de Subtosan dilué à 3 p. 100. (Le Subtosan tient lieu ici de substance adjuvante.)

Voies : sous-cutanée (face externe des cuisses, dos) ; intradermique (face externe de la jambe).

Inoculation : 1er, 2e, 4e, 6e, 8e, 10e, 12e, 18e jours; prélèvement de sang, titrage du taux d'anticorps.

Inoculation : 22e, 25e, 27e, 30e jours ; prélèvement de sang, titrage du taux d'anticorps.

Repos vingt et un jours. Prélèvement du sang, titrage le 45e jour.

Puis injections de rappel les 52e, 54e, 56e jours à doses doubles des doses précédentes. Attendre cinq à sept jours puis prélèvement du sérum des animaux.

Ces animaux qui ont ainsi reçu des doses importantes et répétées d'antigène donnent des sérums ayant un titre d'anticorps élevé comme nous le verrons par la suite. Mais l'inoculation de plasmodiums vivants provoque chez eux une infection mortelle, sans grande différence avec celle qui se développe chez les animaux témoins qui n'ont pas été vaccinés ainsi et qui ont eu la même dose de plasmodiums vivants.

## IV. — POUVOIR ANTICOMPLÉMENTAIRE DES SÉRUMS

Les sérums de Rat sont souvent anticomplémentaires. Pour éviter cet inconvénient, il ne faut prélever le sang de l'animal qu'après que celui-ci ait été mis à jeun depuis au moins douze heures. Ce sont les lipides ingérés qui donnent le pouvoir anticomplémentaire.

Les titrages de complément suivants sont faits en présence respectivement de deux sérums d'un même Rat, l'un des

sérums étant prélevé lorsque le Rat a été mis à jeun, l'autre étant prélevé sans cette précaution.

| | Tube 1 | Tube 2 | Tube 3 | Tube 4 | Tube 5 | Tube 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Complément au 1/30 ..... | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 |
| Sérum pris à jeun ou sérum pris après repas. | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Eau physiologique ..... | 0,30 | 0,25 | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,05 |
| Une demi-heure au bain-marie à 37°. | | | | | | |
| Sérum hémolytique ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Globules rouges à 2 p. 100. | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |

**Résultats :**

— Sérum pris à jeun : hémolyse à partir de 0,20 $cm^3$ de complément au 1/30 (tube 3).

— Sérum pris après repas : hémolyse à partir de 0,35 $cm^3$ de complément au 1/30 (tube 6).

## V. — CONSERVATION DES SÉRUMS

Les sérums prélevés sont décomplémentés par mise au bain-marie à 56° pendant une demi-heure. Puis ils sont mis en présence du stroma d'hématie normale pendant une demi-heure à 37°, enfin, après centrifugation, nous les mettons dans de petits tubes à hémolyse que nous conservons à — 25°. Pour chaque réaction, nous ne prenons que la quantité nécessaire de tubes, les autres restent constamment à — 25°, ce qui permet de conserver longtemps leur activité.

Nous disposons d'un stock de sérums de rats inoculés trois ou quatre fois avec des plasmodiums vivants. C'est toujours sur ce même lot de sérum que nous avons travaillé dans nos essais en vue d'améliorer la réaction de fixation du complément du couple antigène-anticorps paludéen. Et chaque fois que nous voulons titrer les anticorps d'un sérum, c'est toujours en comparaison avec le titre du sérum du stock, les deux réactions étant faites le même jour.

# CHAPITRE IV

## LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Nous employons la technique Kolmer qui a fait ses preuves de sensibilité et de spécificité dans d'autres affections, en particulier dans la syphilis. La fixation se fait en douze ou seize heures à + 6° ou + 8°.

Le titrage du complément se fait non seulement en présence de l'antigène mais aussi du sérum normal pour parer au pouvoir anticomplémentaire de Rat dans la réaction proprement dite.

### Titrage du jour du complément

(Tous nos chiffres sont exprimés en centimètres cubes.)

| | Tube 1 | Tube 2 | Tube 3 | Tube 4 | Tube 5 | Tube 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Complément au 1/30 ..... | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 |
| Sérum normal de rat.... | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Eau physiologique ..... | 0,30 | 0,25 | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,05 |
| Antigène dilué ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Une demi-heure au bain-marie à 37°. | | | | | | |
| Sérum hémolytique à 1/400 ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Globules rouges à 2 p. 100. | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Une demi-heure au bain-marie à 37°. | | | | | | |

La plus forte dilution de complément donnant une hémolyse totale contient la dose minimum active ou unité vraie, et pour la réaction on utilise deux unités vraies amenées à 0,4 cm³.

Cette technique de la réaction de fixation du complément dans le cas du couple antigène-anticorps paludéen a été mise au point par Pautrizel et Nguyên Vinh Niên [27, 28].

### Réaction proprement dite

1° *Qualitative.*

| | Réaction | Témoin sérum | Témoin antigène | Témoin syst. hémol. | Témoin globules |
|---|---|---|---|---|---|
| Sérum à examiner inactivé. | 0,05 | 0,05 | » | » | » |
| Antigène dilué ..... | 0,10 | » | 0,10 | » | » |
| Eau physiologique ..... | » | 0,10 | 0,05 | 0,15 | 0,55 |
| Complément dilué à 2 u.. | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | » |
| Laisser douze à seize heures à 6 - 8° C. Réchauffer dix minutes à 37° C. | | | | | |
| Sérum hémolytique à 1/400 ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Globules rouges à 2 p. 100. | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |

Mettre au bain-marie à 37° pendant une heure. On lit les résultats après lyse complète des témoins sérum et antigène.

Notation des résultats : notation en croix.

On considère l'aspect du tube réaction :

1° Un tube négatif montre une hémolyse complète.

2° Un tube fortement positif (+ + +) montre une absence totale d'hémolyse.

3° Des degrés intermédiaires s'observent :

— Moyennement positif (+ +) si une proportion sensible (le tiers ou la moitié) des globules est lysée ;

— Faiblement positif (+) si une proportion importante (les deux tiers ou les trois quarts) des globules est lysée ;

— Enfin douteux (±) si presque tous les globules sont lysés et ne laissent qu'un léger louche représentant 5 à 15 p. 100 de globules intacts.

2° *Quantitative.*

Pour avoir la réaction quantitative, il suffit de faire des dilutions de plus en plus grandes de sérums à examiner en passant d'un tube à l'autre : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32...

On fera sur chaque dilution la réaction à deux tubes dans les mêmes conditions que le test qualitatif. On note la plus grande dilution qui donne encore une hémolyse incomplète correspondant à +, le tube suivant devant être parfaitement clair.

Quelques résultats

| Taux de dilution ..... | 1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat six fois infecté..... | ++ | ++ | ++ | + | — | — |
| Rat trois fois infecté..... | ++ | ++ | ++ | + | — | — |
| Rat deux fois infecté..... | +++ | + | + | + | + | — |
| Rat une fois infecté, 20e j. après inoculation ..... | ++ | — | — | — | — | — |
| Rat ayant reçu de multiples injections de sang parasité hémolysé par congélation à — 25°.... | +++ | +++ | + | + | — | — |

## I. — INFLUENCE DU *p*H ET DES ÉLECTROLYTES SUR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

La réaction de fixation du complément est grandement influencée par le *p*H du milieu. La charge en ions des molécules d'antigène et d'anticorps varie suivant le *p*H. Mais les électrolytes du milieu ont aussi une grande influence, il faut tenir compte non seulement du *p*H mais aussi de la qualité des électrolytes qui le réalisent.

Le problème est encore plus complexe du fait que chaque couple antigène-anticorps manifeste davantage son union pour un certain *p*H optimum et des électrolytes déterminés.

Les références citées dans les deux paragraphes suivants (Combinaison antigène-anticorps et Fixation du complément) sont données par Boyd [1].

On peut dissocier l'influence du *p*H et des électrolytes sur la réaction de fixation du complément en considérant les deux stades de cette réaction, d'abord la combinaison antigène-anticorps, ensuite la fixation proprement dite du complément.

### Combinaison antigène-anticorps

Coulier a trouvé que l'hémolysine a son activité maximum au *p*H 5,3, près du point isoélectrique de la globuline. D'après de Kruif et Northrop l'agglutinine du bacille typhique agit bien à des *p*H supérieurs à 6, puis au-dessous du *p*H 6 son activité décroît pour être presque abolie à partir du *p*H 4.

Quant à l'action des électrolytes, Bordet a montré que ceux-ci sont nécessaires pour l'agglutination des bactéries. Pour le couple hémolysine-globules rouges, la présence d'une solution de chlorure de sodium hypertonique inhibe considérablement la réaction.

La combinaison antigène-anticorps peut se faire sans la présence d'électrolytes dans certains cas rares comme dans le cas cité par Duncan de l'agglutinine O et les bactéries flagellaires intestinales. Mais en général elle est aidée jusqu'à un certain degré par la présence des électrolytes. Mais au-dessus d'une certaine concentration, les électrolytes ont un effet inhibiteur. Marrack suggère que si les électrolytes sont en grande concentration, ils forment une atmosphère d'ions autour des ions de charge contraire de l'antigène et de l'anticorps, ce qui réduit leur pouvoir d'attraction.

### Fixation du complément

La fixation du complément ne se fait pas en l'absence des électrolytes, de même quand la concentration de ceux-ci dépasse une certaine limite. (Dans le cas du chlorure de sodium, l'optimum est de l'ordre de 0,85 p. 100 de chlorure de sodium.) Le baryum, le calcium inhibent la fixation du complément. Le magnésium active à une certaine concentration.

Quant au *p*H, Boyd [1] a montré qu'il est optimum dans les environs de 6,3-7,8.

### Influence du *p*H et des électrolytes dans le cas de la réaction de fixation du complément du couple antigène-anticorps paludéen

Nous avons cherché le *p*H et les électrolytes qui conviennent pour notre antigène et le sérum paludéen. Pour cela nous avons dû tâtonner, nous avons essayé de nombreuses substances tampons de composition très variée, tous ces tampons devant être isotoniques. Pour chaque substance tampon, nous avons essayé son activité dans la gamme de *p*H variant de 7 à 10, qui est la gamme compatible avec la réaction de fixation du complément.

Nous avons dû modifier le protocole de la réaction de fixation du complément, la réaction en présence d'un tampon amené à un *p*H est précédée d'un titrage du complément réalisé exactement au même *p*H de ce tampon. Dans la préparation des dilutions, l'eau phsiologique est remplacée par le tampon, pour que dans chaque tube à réaction se trouve la même quantité de tampon.

Enfin, dans les multiples expériences, c'est toujours avec le même sérum du stock que nous utilisons, de manière à travailler autant que possible dans les mêmes conditions. Le résultat de chaque essai avec un tampon est comparé avec celui d'une réaction témoin, faite avec de l'eau physiologique.

### Titrage du complément

| | Tube 1 | Tube 2 | Tube 3 | Tube 4 | Tube 5 | Tube 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum normal de Rat..... | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Complément au 1/30 dilué dans le tampon ou l'eau physiologique ..... | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 |
| Tampon ou eau physiologique ..... | 0,30 | 0,25 | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,05 |
| Antigène dilué dans tampon ou eau physiol..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Une demi-heure au bain-marie à 37°. | | | | | | |
| Sérum hémolytique à 1/400 ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Globules rouges à 2 p. 100. | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Une demi-heure au bain-marie à 37°. | | | | | | |

La plus forte dilution de complément donnant une hémolyse totale contient la dose minima active ou unité vraie, et pour la réaction on utilise deux unités vraies amenées à 0,4 cm³.

### Réaction proprement dite

| | Réaction | Témoin sérum | Témoin antigène | Témoin syst. hémol. | Témoin globules |
|---|---|---|---|---|---|
| Sérum inactivé dilué au 1/2, 1/4 ..... | 0,05 | 0,05 | » | » | » |
| Antigène dilué dans tampon ou eau physiol..... | 0,10 | » | 0,10 | » | » |
| Tampon ou eau physiol... | » | 0,10 | » | 0,10 | 0,55 |
| Eau physiologique ..... | » | » | 0,05 | 0,05 | » |
| Complément à 2 u. dilué dans tampon ou eau physiologique ..... | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | » |
| Douze à seize heures à 6 - 8° C. 37° pendant dix minutes. | | | | | |
| Sérum hémolytique à 1/400 ..... | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Globules rouges à 2 p. 100. | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |

RÉSULTATS :

**Système tampon véronal sodique acide chlorhydrique**

(Gamme de *p*H essayé : de *p*H 6,7 à 9,8.)

| | |
|---|---|
| Témoin à l'eau physiologique ..... | + + + à 1/16. |
| Tampon à *p*H 7 ..... | + à 1/32. |
| | + + + à 1/16. |
| Mêmes électrolytes mais *p*H différents | + + + à 1/8. |

**Tampon au véronal sodique véronal**

(à *p*H = 7,2.)

| | |
|---|---|
| Témoin à l'eau physiologique ..... | + + + à 1/16. |
| Tampon ..... | + + à 1/8. |

**Tampon phosphate de sodium acide citrique**

| | |
|---|---|
| Témoin avec l'eau physiologique ..... | + + à 1/16. |
| | + + + à 1/8. |
| Tampon *p*H 6,8 ..... | + + à 1/4. |
| *p*H 7 ..... | + + à 1/4. |
| *p*H 7,2 ..... | + + + à 1/4. |

**Tampon phosphate monopotassique disodique**

| | |
|---|---|
| Témoin avec l'eau physiologique ..... | + + à 1/16. |
| | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 6,7 ..... | |
| *p*H 7 ..... | |
| *p*H 7,3 ..... | |
| *p*H 7,7 ..... | + à 1/8. |
| *p*H 8 ..... | |
| *p*H 8,3 ..... | |

**Tampon de Michaelis véronal sodique**
**acétate de sodium**
**acide chlorhydrique**

*Première expérience :*

| | |
|---|---|
| Témoin avec l'eau physiologique ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 6,99 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 7,25 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 7,42 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 7,90 ..... | + à 1/32.<br>+ + + à 1/16.<br>+ + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,55 ..... | + + à 1/32.<br>+ + + à 1/16.<br>+ + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,90 ..... | + + + à 1/16.<br>+ + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 9,64 ..... | + + à 1/8. |

*Deuxième expérience identique :*

| | |
|---|---|
| Témoin à l'eau physiologique ..... | + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 7,42 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 7,90 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,18 ..... | + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,55 ..... | + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,68 ..... | + + + à 1/8. |
| Tampon à *p*H 8,90 ..... | + + + à 1/8. |

D'après le résultat de ces deux expériences nous voyons que le tampon de Michaelis (véronal, acétate de sodium, acide chlorhydrique) donne une activation de la réaction dans la zone du *p*H 7,90 surtout.

Composition du tampon de Michaelis :

| | |
|---|---|
| 5 cm³ (acétate de sodium + véronal sodique) ..... | Acétate de sodium, 1/7 de mol. : 19,438 g de $CH_3COONa$. |
| 2 cm³ de chlorure de sodium (à 8,5 g p. 100) ..... | Véronal sodique, 1/7 de mol. : 14,727 g dissous dans 500 cm³ d'eau distillée exempte de $CO_2$. |

| HClN/10 (en cm³) | $H_2O$ (en cm³) | Valeur du *p*H à 25° |
|---|---|---|
| 6 » | 14 » | 6,99 |
| 5,5 | 14,5 | 7,25 |
| 5 » | 15 » | 7,42 |
| 4 » | 16 » | 7,66 |
| 3,0 | 17 » | 7,90 |
| 2,0 | 18 » | 8,18 |
| 1,0 | 19,0 | 8,55 |
| 0,75 | 19,25 | 8,68 |
| 0,5 | 19,5 | 8,90 |
| 0,25 | 19,75 | 9,16 |
| 0 » | 20 » | 9,64 |

## II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES ÉLECTROLYTES DANS LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT DANS LE CAS DU COUPLE ANTIGÈNE - ANTICORPS PALUDÉEN.

Nous avons essayé de diluer le tampon ci-dessus de façon à donner aux électrolytes une concentration optimum. Nous avons vérifié auparavant que la dilution de ce tampon dans l'eau physiologique n'affecte pas la valeur du tampon si le taux de dilution ne dépasse pas la valeur de 1/10. C'est ce tampon à *p*H 7,90 dilué au 1/4 que nous avons d'abord essayé.

*Première expérience :*

Témoin à l'eau physiologique ..... + à 1/8.
++ à 1/4.
+++ à 1/2.

Tampon à *p*H 7,90 dilué au 1/4 ..... + à 1/16.
++ à 1/8.
+++ à 1/4.
+++ à 1/2.

*Deuxième expérience identique :*

Témoin à l'eau physiologique ..... + à 1/4.
++ à 1/2.

Tampon à *p*H 7,90 dilué au 1/4 ..... + à 1/4.
++ à 1/2.

Ensuite nous avons essayé ce même tampon mais à *p*H 8,18 dilué au 1/2.

*Première expérience :*

Témoin à l'eau physiologique ..... +++ à 1/16.

Tampon à *p*H 8,18 dilué à 1/2 ..... ++ à 1/64.
+++ à 1/32.
+++ à 1/16.
+++ à 1/8.
+++ à 1/4.

*Deuxième expérience identique :*

Témoin à l'eau physiologique ..... ++ à 1/2.

Tampon à *p*H 8,18 dilué à 1/2 ..... + à 1/4.
++ à 1/2.

Par la suite, c'est ce système tampon Michaelis (véronal, acétate de sodium, acide chlorhydrique) dilué au 1/2 que nous avons choisi pour nos expériences ultérieures.

## III. — INFLUENCE DE LA POLYVINYL PYRROLIDONE (OU SUBTOSAN) SUR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Neuzil, Pautrizel et Marquevielle [26] ont montré que la polyvinyl pyrrolidone accélère l'apparition du précipité dans un mélange antigène-anticorps. Ces auteurs l'ont vérifié sur les couples sérum antidiphtérique de cheval-anatoxine diphtérique, sérum antitétanique-anatoxine tétanique, etc... Dans toutes ces expériences, la réaction antigène-anticorps conserve toute sa spécificité et l'allure générale de la courbe de floculation pour différentes proportions d'antigène et d'anticorps est conservée. La polyvinyl pyrrolidone accélère la floculation mais dépassé la concentration de 10 p. 100, elle a un effet inhibiteur.

Pautrizel et Pautrizel-Bézian [29] ont montré ensuite que la polyvinyl pyrrolidone a également une influence accélérante sur la rapidité et l'intensité de la production du phénomène anaphylactique. Cette action se trouve vérifiée *in vivo*, chez le cobaye sensibilisé passivement par l'injection du sérum de lapin antipseudoglobuline de mouton à qui l'on injecte la pseudoglobuline de mouton. Elle se trouve vérifiée *in vitro* sur le phénomène de Schutz Dale. Un fragment de l'iléon de cobaye sensibilisé passivement répond par une contraction plus grande à l'addition de l'antigène, quand la polyvinyl pyrrolidone existe dans la proportion de 3 p. 100 dans le liquide d'immersion.

Toutes ces expériences suggèrent que la polyvinyl pyrrolidone accélère la combinaison antigène-anticorps et en augmente l'intensité. Ce polymère hydrosoluble parfaitement neutre conserve la spécificité à la réaction. Il agit comme une macromolécule avec une remarquable capacité de liaison. La concentration optimum semble être de l'ordre de 3 p. 100.

### *p*H de la polyvinyl pyrrolidone

Le *p*H d'une solution de polyvinyl pyrrolidone, préparée à partir de la polyvinyl pyrrolidone (en abréviation P V P) en poudre, à la concentration de 3,2 p. 100 dans l'eau physiologique est de 4. Pour l'employer dans la réaction de fixation du complément, il faut ramener ce *p*H vers 7 et justement le tampon de Michaelis, qui, nous l'avons vu, active la réaction, va permettre de le faire.

Les tableaux suivants donnent le *p*H d'une solution de polyvinyl pyrrolidone (P V P) à 3,2 p. 100 dans des dilutions de plus en plus grandes de tampon de Michaelis dans l'eau physiologique.

*Tampon Michaelis à p*H 7,90

| | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon pur | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/2 | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/4 | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| *p*H à 25°. | 7,72 | 7,66 | 7,66 | 7,30 |

*Tampon Michaelis à p*H 8,45

| | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon pur | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/2 | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/4 | P V P à 3,2 p. 100 dans tampon au 1/8 |
|---|---|---|---|---|
| *p*H à 25°. | 8,40 | 8,40 | 8,12 | 7,90 |

Nous voyons que la P V P à environ 3 p. 100 peut être employée en présence du tampon de Michaelis dilué au 1/2 ou au 1/4.

### La polyvinyl pyrrolidone dans la réaction de fixation du complément du couple antigène-anticorps paludéen

Nous employons le même protocole opératoire déjà exposé page 27. Nous avons essayé la P V P diluée dans le tampon et le résultat est comparé avec celui que don-

nent les réactions témoins faites respectivement avec l'eau physiologique et le tampon de même *p*H, dilué dans la même proportion.

*P V P à 3 p. 100 diluée dans le tampon à p*H 7,90 *au* 1/4

*Première expérience :*

Témoin à l'eau physiologique ..... + à 1/8.
+ à 1/4.
+ + + à 1/2.

Témoin au tampon dilué au 1/4 ..... + à 1/16.
+ + à 1/8.
+ + + à 1/4.
+ + + à 1/2.

P V P à 3 p. 100 dans le tampon au 1/4. + à 1/32.
+ à 1/16.
+ + + à 1/8.
+ + + à 1/4.
+ + + à 1/2.

*Deuxième expérience identique :*

Témoin à l'eau physiologique ..... + à 1/4.
+ + à 1/2.

Témoin avec tampon à *p*H 7,90 au 1/4 . + à 1/4.
+ + + à 1/2.

P V P à 3 p. 100 diluée dans le tampon à pH 7,90 au 1/4 ..... + à 1/8.
+ + à 1/4.
+ + + à 1/2.

*P V P à 3 p. 100 dans le tampon à p*H 8,18 *dilué au* 1/2

Témoin à l'eau physiologique ..... + + à 1/2.

Témoin avec le tampon à *p*H 8,18 dilué au 1/2 ..... + à 1/4.
+ + à 1/2.

P V P à 3 p. 100 diluée dans le tampon à *p*H 8,18 dilué au 1/2 ..... { + à 1/32. ; + + à 1/16. ; + + à 1/8. ; + + à 1/4. ; + + à 1/2.

Témoin fait avec un sérum de Rat normal, en présence de P V P à 3 p. 100 dans le tampon à *p*H 8,18 dilué au 1/2 : négatif.

*P V P à 6 p. 100 dans le tampon à pH 8,18 dilué au 1/2*

Témoin à l'eau physiologique : + + + 1/16.

P V P à 6 p. 100 dans le tampon à *p*H 8,18 dilué au 1/2 : négatif.

C'est la P V P à 3 p. 100 dans le tampon à *p*H 8,18 dilué au 1/2 qui semble donner les meilleurs résultats. La P V P à 6 p. 100 inhibe la réaction.

APPLICATIONS SUR LES SÉRUMS DE RATS AYANT REÇU DES DOSES MULTIPLES D'ANTIGÈNE (voir p. 20).
RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT EN PRÉSENCE DE P V P A 3 P. 100 DANS LE TAMPON A *p*H 8,18 DILUÉ AU 1/2

**Sérums du Rat D :**

| Dilutions ..... | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum prélevé le 18e j. après la 1re injection. | Négatif. | | | | | | |
| Sérum prélevé le 22e j. après la 1re injection. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + | + + | — | — |
| Sérum prélevé le 30e j. après la 1re injection. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + | + + + | — |
| Sérum prélevé le 52e j. après la 1re injection. | Anticomplémentaire. | | | | | | |
| Témoin fait sur le sérum du stock..... | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + | — | — |

**Sérums du Rat G :**

| Dilutions ..... | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum prélevé le 18e j. | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + |
| Sérum prélevé le 54e j. | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + |
| Sérum prélevé le 15e j. après l'inoculation de plasmodiums vivants. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + |
| Témoin fait sur le sérum du stock..... | Anti-compl. | + + + | + + + | + + + | — | — | — |

**Sérums du Rat I :**

| Dilutions ..... | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sérum prélevé le 18e j. après la 1re injection. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + | - - |
| Sérum prélevé le 52e j. | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | — | — |
| 15e j. après l'inoculation de plasmodiums vivants ..... | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + |
| Témoin fait sur le sérum du stock..... | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | Anti-compl. | + + + | + + + | + | — |

# CHAPITRE V

## INFLUENCE DE LA POLYVINYL PYRROLIDONE SUR LE COUPLE ANTIGÈNE-ANTICORPS SYPHILITIQUE

### I. — RÉACTION DE FLOCULATION

Technique de Kline en utilisant l' « exclusive-test » de Rein-Brossak, la solution antigénique est chauffée à 56° puis centrifugée de façon à éliminer les fines particules susceptibles de saturer une partie des anticorps sans agglutination visible.

La P V P est toujours employée en solution dans le tampon de Michaelis à *p*H 8,18 dilué au 1/2. Nous avons essayé des concentrations de P V P variant de 1 p. 100 à 4 p. 100. Le sérum employé a été choisi très riche en réagines de façon à ce que la réaction soit positive même aux fortes dilutions. En effet, le sérum est dilué dans la solution de P V P tamponnée, la réaction est faite à partir de la dilution de 1/8 de façon à ce que le sérum soit toujours en présence d'un excès de solution de tampon contenant une dose de P V P connue.

**Protocole :**

| | Sérum dilué à 1/8, 1/16... 1/256, dans l'eau physiologique, ou dans le tampon, ou dans une solution de P V P à 1 p. 100 tamponnée, . . . . . ou dans une solution de P V P à 4 p 100 tamponnée. | Suspension antigénique | Eau physiologique, ou tampon, ou solution de P V P à 1 p. 100 tamponnée, . . . . . ou solution de P V P à 4 p. 100 tamponnée. |
|---|---|---|---|
| Tube réactionnel . . . | 0,05 | 1/40 cm³ | |
| Témoin antigène . . | | 1/40 cm³ | 0,05 |

Agitateur de Kline pendant quatre minutes. Lecture au microscope.

**Résultats :**

| Dilutions . . . . . | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Témoin fait sur eau physiologique . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + | — | — |
| Témoin fait sur tampon seul . . . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + | — | — |
| P V P à 1 p. 100 dans tampon . . . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + | — |
| P V P à 2 p. 100 dans tampon . . . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + | — |
| P V P à 3 p. 100 dans tampon . . . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + + | — |
| P V P à 4 p. 100 dans tampon . . . . . | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + | — |
| Sérum normal en présence de P V P à 3 p. 100 dans le tampon . . . . . | Négatif. | | | | | |

Le système P V P à 3 p. 100 dans le tampon de Michaelis dilué au 1/2 donne les meilleurs résultats. De plus il conserve la spécificité à la réaction, il ne donne pas de fausses réactions positives.

## II. — RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

Nous avons essayé la P V P à des concentrations de 1 p. 100 à 6 p. 100 dans le tampon de Michaelis à *p*H 8,18 dilué au 1/2. Le protocole opératoire est le même que celui du couple antigène-anticorps paludéen.

*Première expérience :*

| Dilutions ..... | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Témoin fait sur eau physiologique ... | + + + | + + + | + + | | — | | | - - |
| Témoin fait sur tampon seul ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | - - | — | — |
| P V P à 1 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | — | — | — | — |
| P V P à 2 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | — | — | | |
| P V P à 3 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | — | | | |
| P V P à 5 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | + + | - |
| P V P à 6 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | — | — | — |

*Deuxième expérience :*

| Dilutions ..... | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Témoin fait sur eau physiologique ... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | — | - |
| P V P à 4 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | - - |
| P V P à 5 p. 100 dans tampon ..... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + | - - |
| Sérum normal en présence de P V P à 5 p. 100 dans le tampon ..... | Négatif. | | | | | | | |

Pour la réaction de fixation du complément du couple antigène-anticorps syphilitique, c'est la P V P à 4 p. 100 ou 5 p. 100 dans le tampon de MICHAELIS dilué au 1/2 qui donne les meilleurs résultats. Et là aussi, l'essai avec un sérum normal ne donne pas de fausses réactions positives.

# CONCLUSIONS

I. — En nous servant des ultrasons, nous avons préparé un antigène en partant des hématies de Rat parasité par le *Plasmodium Berghei*. Cette nouvelle technique permet de broyer au maximum les particules antigéniques, tout en évitant les congélations, décongélations et broyages au mortier, opérations qui risquent de diminuer le pouvoir antigénique.

II. — Nous avons aussi cherché à améliorer la réaction de fixation du complément du couple antigène-anticorps paludéen. Nous avons montré que le tampon de Michaelis (acétate de sodium, véronal, acide chlorhydrique) associé à la polyvinyl pyrrolidone donne les meilleurs résultats. Certains de nos sérums titrés par cette méthode montrent un taux d'anticorps très élevé, la réaction est positive jusqu'à la dilution de 1/128. De plus le système tampon Michaelis-P V P conserve toute spécificité à la réaction antigène-anticorps.

III. — Enfin le système tampon Michaelis-P V P améliore aussi la réaction antigène-anticorps syphilitique. Ceci a été vérifié aussi bien sur la réaction de floculation que sur la réaction de fixation du complément.

## SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
*Le Doyen,*
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
*Le Président,*
R. SIGALAS.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 25 Octobre 1956
*Le Recteur,*
E. DELAGE.

# BIBLIOGRAPHIE


1. Boyd (W. C.). — Fundamentals of immunology, 1 vol. Intersc. publ. Inc. édit., New York, 1947, 219-220, 300.
2. Carlson (M. J.), Mueller (M. G.) & Bissel. — *J. labo. and clin. Med.*, 1946, **31**, 677-686.
3. Chorine (V.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 19.
4. Chorine (V.). — *Arch. Inst. Prophyl.*, 1938, **10**, 202-216.
5. Chorine (V.). — *Bull. Soc. Path. ex.*, 1938, **31**, 838-840.
6. Christophers (R.) & Fulton (J. D.). — *Am. trop. Med. and parasitol.*, mars 1939, **33**.
7. Coggeshall (L. T.). — *Proc. Ind. Acad. of Sc.*, 3 mai 1940, **50**.
8. Coggeshall (L. T.). — *Anal. Rev. Génér. Méd., Neurol.*, mai 1943, **22**, n° 2.
9. Davis-Bernard (D.). — *J. of immun.*, 1948, **58**, 269-281.
10. de Blasi (D.). — *Ann. d'Igiene spec.*, 1907.
11. Dulaney (A. D.) & Morrison (D. B.). — *The Amer. J. of Med.*, 1944, **24**, 323-326.
12. Dulaney (A. D.), Stratman-Thomas (W.) & Waar (O. S.). — *J. inf. dis.*, 1942, **70**, 221-225.
13. Dulaney (A. D.), Stratman-Thomas (W.) & Waar (O. S.). — *J. bact.*, janv. 1941, **41**, 66.
14. Eaton, Single, Mulligan. — Cité par Coggeshall [8].
15. Gasparini (A.). — Cité par Servanton [31].
16. Halpern (B. N.) & Pacaud (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1.465-1.466.
17. Harris (A. D.) & Reidel (L. M.). — *The Amer. J. of trop. Med.*, novembre 1948, **28**, n° 6.
18. Horrowitz Wlassowa (L.). — Cité par Servanton [31].
19. Kliger & Yoeli. — *The Amer. J. of trop. Med.*, juillet 1941, **21**, n° 4, 531-543.
20. Lippincott (W.), Gordon (H.), Hesselbrock (W. M. B.) & Marble (A.). — *J. clin. Inv.*, 1945, **24**, 362.
21. Lo Monicho & Panichi. — Cité par Mannoni.
22. Lowel (F.), Coggeshall (L. T.), Monroe (D.) & Eaton. — *J. exp. Med.*, 1938, **67**.
23. Malamos. — Cité par Coggeshall [8].

24. Mannoni (J.). — Thèse Médecine, Paris, 1936.
25. Massa (M.). — *Pathologica,* 1929, **21**, 18-23.
26. Neuzil (E.), Pautrizel (R.) & Marquevielle (J.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1949, **14**.
27. Nguyên Vinh Niên. — Thèse Pharmacie, Bordeaux, 1953.
28. Pautrizel (R.) & Nguyên Vinh Niên. — *Bull. Soc. de Pathol. exotique,* 1953, **46**, 671-673.
29. Pautrizel (R.) & Pautrizel-Bézian (A.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1950, **144**.
30. Pewny (W.). — Cité par Servanton [31].
31. Servanton (P.). — Thèse de Médecine, Bordeaux, 1934.
32. Sutliff (W.), Dulaney (A. D.) & Davis (L.). — *J. nat. mal. Soc.,* mars 1950, **9**, n° 1.
33. Taliaferro (W. H.), Taliaferro (L. G.) & Fisher (B.). — *J. Prev. Med.,* 1927.
34. Thomson (J. G.). — *British Medical Journal,* 1918.
35. Vargues (R.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1951, **145**, 1.134.
36. Zieman (H.). — Cité par Servanton [31].

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.